EVALUACIÓN DE SOMACLONES DE TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.*)* OBTENIDOS A PARTIR DEL CV. ´CUBA C- 2781' MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE SELECCIÓN *IN VITRO* Y VARIACIÓN SOMACLONAL.

Amelia Capote, Alberto G. Martínez, Odalys Pérez, Odalys Llorente, Amarilys Cruz y Ma. Onelia Sosa.
Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT).

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el comportamiento en condiciones de campo frente al tizón temprano y las características agronómicas y morfológicas de 18 somaclones de tomate obtenidos por las técnicas de selección *in vitro* a partir del cv. 'Cuba C-2781' en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos del INIFAT. Los experimentos se condujeron en el Organopónico "Van Troi" ubicado en el Municipio Boyeros, Ciudad de la Habana en el período comprendido de Septiembre/05 a Febrero/06. Se evaluaron un total de 8 caracteres, y con los datos obtenidos se realizó un análisis de componentes principales y un análisis de conglomerado utilizando la Distancia Métrica Euclidiana según el programa estadístico Statgraphics, Versión 5,0. El ACP mostró que las 3 primeras componentes acumularon el 79,3 % de la variabilidad total observada, resultando las mayores contribuciones por componente para las variables masa promedio de los frutos (PPF), número total de frutos (NTF) y contenido de sólidos solubles (SS) (componentes 1, 2 y 3 respectivamente). El análisis de conglomerados posibilitó agrupar los materiales en 3 grupos, el grupo I con un total de 8 somaclones (42,1 %), el grupo II integrado por 7 materiales (36,8 %) y el grupo III por 4 somaclones (21,1 %) donde se incluye el cultivar original utilizado como control. Estos resultados indican que se obtuvieron un total de 15 somaclones (78,93 %) que difieren del cultivar original, lo que evidencia la efectividad de las técnicas biotecnológicas empleadas para la obtención de nueva variabilidad genética en esta especie.

Palabras claves: selección *in vitro*, tomate, variación somaclonal.

ASTRACT

The present work was carried out with the objective to evaluate, in field, the behaviour to early blight and the agronomics and morphologic characteristics to eighteen somaclones of tomato obtained by *in vitro* selection from cv. 'Cuba C- 2781' in the Tissue Culture Laboratory of INIFAT. The experiment was conducted in Organopónico 'Van Troi' from Boyeros, Ciudad de La Habana during September/05 to February/06. There were evaluated 8 characters and with the results were realized a principal components analysis (ACP) and a cluster analysis using a Euclidean distance metric by StatGraphics Program version 5,0. The ACP showed that 3 components have extracted the 79,3 % of the variability and the variables fruit average weight, total of fruit number y soluble solid content showed the higher weights by components (1, 2 y 3 respectively). Cluster analysis created 3 clusters, the cluster I with 8 members (42,1 %), the cluster II with 7 members (36,8 %) and the cluster III with 4 members (21,1 %) among them the original cultivar 'Cuba C- 2781' (control). The results indicated that was possible to obtaine 15 somaclones (78,93 %) different of original cultivar. It demonstrated the effectively of biotechnological techniques in order to induce a new genetic variability in this specie.

Key words: *in vitro* selection, tomato, somaclonal variation.

INTRODUCCION

Una de las principales enfermedades que afecta el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L. [Peralta *et al.,* 2005, syn. *L. esculentum* Mill.]*)* es el tizón temprano causada por el hongo *Alternaria solani*; sin embargo, la obtención de nuevos genotipos tolerantes o resistentes a este patógeno esta limitada, debido a las dificultades dadas por la baja variabilidad existente en la especie (Miller y Tanksley, 1990) y las limitaciones para la transferencia de genes por métodos convencionales de mejoramiento genético (Álvarez y Torres, 1983).

Las técnicas de cultivo de tejidos posibilitan la obtención de nueva variabilidad y de hecho han sido ampliamente utilizadas para el mejoramiento genético de un gran número de especies (Al-Zahim *et al*., 1999). Dentro de ellas, la selección *in vitro* permite la inducción de variantes tolerantes a estrés abiótico o biótico, sometiendo las células a una presión de selección al utilizar un agente selectivo en el medio de cultivo (Ingram y MacDonald, 1985).

La utilización de los filtrados de *A. solani* en trabajos de selección *in vitro* para la inducción de variantes somaclonales ha sido reportada con resultados satisfactorios en cultivos como la papa (Hernández *et al.,* 1991; García *et al.,* 1998) y el tomate (Sheppard y Sohndal, 1986).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento en condiciones de campo de los somaclones de tomate, seleccionados *in vitro* según su respuesta a *A. solani*, para detectar la posible variación inducida por las técnicas biotecnológicas.

MATERIALES Y METODOS

Se emplearon semillas procedentes de 18 somaclones de tomate, los cuales fueron seleccionados *in vitro* a partir del cultivo de segmentos nodales del cv. 'Cuba C-2781' (altamente susceptible) en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 75% de filtrado crudo del hongo *Alternaria solani*, como agente selectivo*,* según la metodología desarrollada en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos del INIFAT y que mostraron diferentes grados de susceptibilidad al ataque del patógeno (tabla 1) al ser inoculados artificialmente en condiciones semi-controladas (Capote *et al.,* 2004).

Los experimentos se desarrollaron en el Organopónico "Van Troi" ubicado en el Municipio Boyeros, Ciudad de La Habana en el período comprendido de Septiembre/05 a Febrero/06. Las semillas se sembraron para su germinación en cepellones de 247 alvéolos con un sustrato compuesto por suelo Ferralítico Rojo (50%), materia orgánica (45%) y cascarilla de arroz (5%). A los 21 días de germinadas fueron trasplantadas a canteros con un sustrato compuesto por suelo Ferralítico Rojo (65%) y materia orgánica (estiércol vacuno) (35%), a doble hilera con una distancia entre plantas de 30 cm. Se sembraron 20 plantas de cada material. A los 25 días posteriores al trasplante se aplicó humus de lombriz (1 Kg/m^2).

Durante todo el experimento se emplearon las normas técnicas del Instructivo de Cultivo Protegido para las labores de deshije, deshoje y conducción para los tomates de tipo indeterminado y el riego por microyet según las Normas Técnicas para Organopónicos. Semanalmente se realizaron aplicaciones de Tabaquina y cal para el control de plagas y enfermedades.

Los valores de temperatura (máxima, media y mínima- ^{0}C), humedad relativa (%) y precipitaciones (mm) fueron registrados mensualmente durante todo el período en que se desarrolló el experimento.

Tabla 1. Materiales de tomate seleccionados para su evaluación en condiciones de campo

No.	Genotipos	Clasificación según el comportamiento frente a la inoculación artificial del patógeno
1	Cuba C 2781 (control)	Altamente susceptible
2	14	Susceptible
3	20	Susceptible
4	60	Susceptible
5	71	Susceptible
6	12	Moderadamente susceptible
7	29	Moderadamente susceptible
8	32	Moderadamente susceptible
9	44	Moderadamente susceptible
10	48	Moderadamente susceptible
11	68	Moderadamente susceptible
12	16	Moderadamente resistente
13	38	Moderadamente resistente
14	52	Moderadamente resistente
15	72	Moderadamente resistente
16	17	Resistente
17	24	Resistente
18	35	Resistente
19	58	Resistente

En un total de 10 plantas se evaluaron, en el primer y segundo racimo, un total de 7 caracteres: PPF- Masa promedio de los frutos (g), NTF- Número total de frutos, PTF- Masa total de los frutos (g), DE- Diámetro ecuatorial (cm), DP- Diámetro polar (cm), SS- Sólidos solubles y % H- Porcentaje de humedad.

Para la determinación del grado de tolerancia al ataque de *A. solani* se empleó una escala de 0 a 5, 0- sin afectación, 1- pequeñas manchas aisladas, 2- 25% del área foliar afectada, 3 – 50% del área foliar afectada, 4- 75% del área foliar afectada, 5- >75% del área foliar afectada.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de componentes principales y un análisis de conglomerado utilizando la Distancia Métrica Euclidiana según el programa estadístico StatGraphic Plus, versión 5,0 (1994-2000) y se calcularon los principales estadígrafos de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación) para cada grupo formado utilizando el Programa Excel de Microsoft Office 2003.

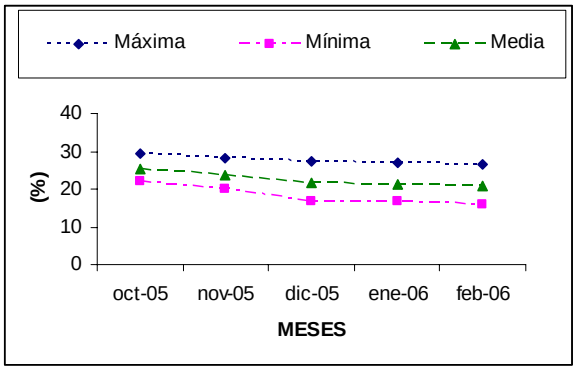
RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1 se muestran los valores de los datos climáticos registrados durante los meses de Octubre/05 a Febrero/06. Como se puede observar la temperatura media osciló entre 20,9 y 25,3 ^{0}C, por lo que se mantuvieron dentro del rango establecido para el

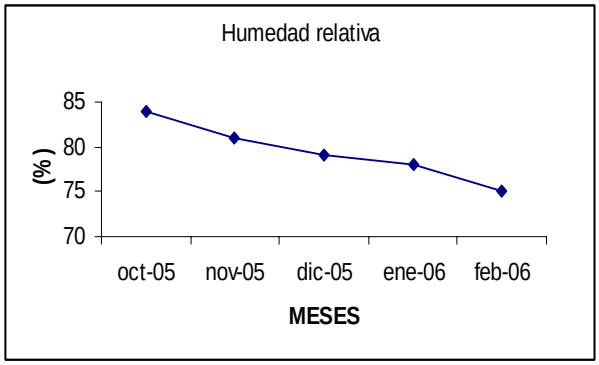
cultivo, si tenemos en cuenta que según Carvalho *et al*. (1994) las temperaturas optimas para los diferentes estadios de desarrollo del tomate oscilan entre 14 y 29^{0}C.

Con relación a la humedad relativa los valores fluctuaron entre 75 y 84% con la tendencia a disminuir desde el mes de diciembre hasta febrero, considerándose según Nuez (1995) que los valores óptimos para el cultivo están entre 70 y 80%. Las precipitaciones mensuales presentaron una distribución variada, el mes de octubre se caracterizo por un alto valor de precipitaciones (224,9 mm) disminuyendo en el resto de los meses hasta alcanzar un valor crítico en el mes de noviembre/05 (8,8 mm).

a) Temperatura



b) Humedad Relativa



c) Precipitaciones

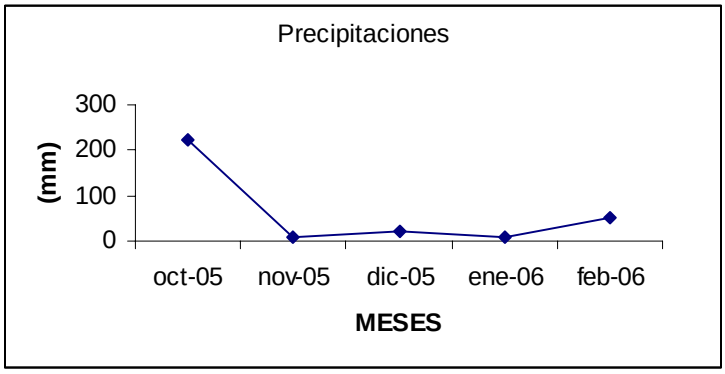


Figura 1. Datos climatológicos durante el período de desarrollo del experimento.

El Análisis de Componentes Principales efectuado teniendo en cuenta las variables de rendimiento y el comportamiento frente al patógeno, permitió constatar que las tres primeras componentes extrajeron el 79,31% de la variación total inducida en los somaclones evaluados (tabla 2).

Las variables morfoagronómicas más importantes fueron la masa promedio de los frutos (PPF), el número total de frutos (NTF) y el contenido de sólidos solubles (SS), lo cual indica el valor discriminatorio de estos caracteres en la clasificación de los somaclones seleccionados *in vitro.*

Tabla 2. Resultados del Análisis de Componentes Principales.

Ejes principales	**C1**	**C2**	**C3**
Valores propios	2.8621	2.2295	1.2536
Contribución a la variación total	35.77	27.86	15.67
% acumulado	35.77	63.64	79.31
Vectores propios			
PPF	**0.4761**	-0.3427	0.0861
PTF	0.4154	0.3909	0.3062
DE	0.4080	-0.3797	0.1316
DP	0.3639	-0.2432	0.2010
NFT	0.3062	**0.4991**	0.2938
SS	-0.2455	-0.3197	**0.5659**
% H	0.3445	0.2147	-0.5058
Resist	-0.1701	0.3588	0.4225

En la figura 2 se observa la distribución de las variables evaluadas en el plano formado por las componentes C1 y C2 y la posición relativa de los genotipos con relación a ambos componentes, lo que permite hacer un ordenamiento de los genotipos a partir de su proyección sobre los vectores, ya que los más próximos al origen de las coordenadas son los que tendrán un comportamiento más estable.

La variabilidad en la respuesta de los genotipos evaluados que se observa en el gráfico de los componentes principales, muestra la presencia de la variación somaclonal en tomate, teniendo en cuenta la dispersión de los somaclones en relación con el cultivar original ‘Cuba C- 2781’.

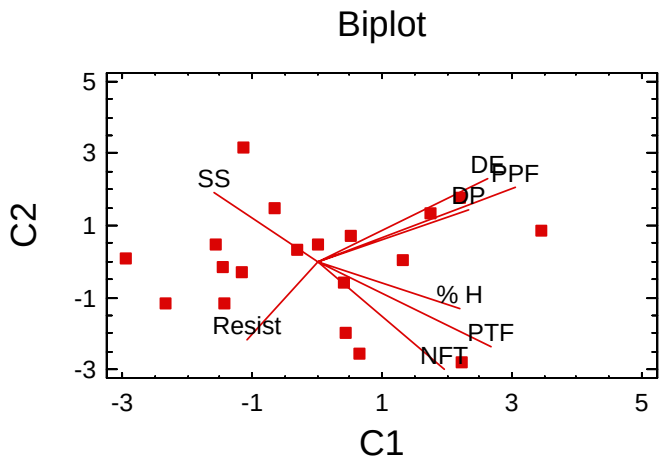


Figura 2. Biplot con las variables estudiadas y la posición relativa de los somaclones.

En cuanto a las variables estudiadas se observa una clara tendencia a la disminución de los componentes del rendimiento con el grado de resistencia mostrado. Estos resultados confirman la relación existente entre estas variables y la resistencia a *A. solani*, aspecto planteado anteriormente por otros autores (Álvarez y Torres, 1983). .

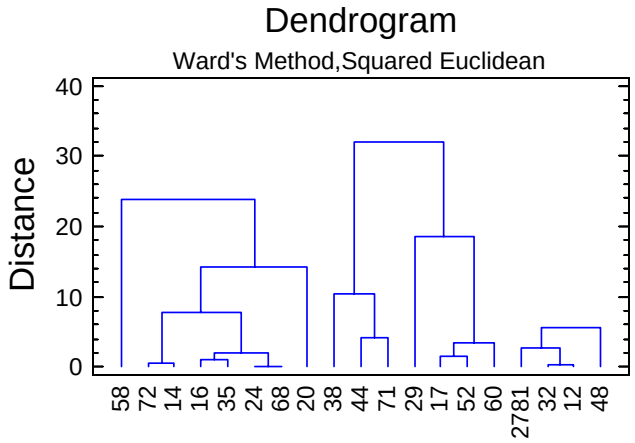


Figura 3. Dendrograma obtenido a partir de las distancias genéticas entre los materiales estudiados. (Los números coinciden con los de la Tabla 1).

El Análisis de Conglomerados posibilitó agrupar los materiales en 3 grupos, el grupo I con un total de 8 somaclones (42,1 %), el grupo II integrado por 7 materiales (36,8 %) y el grupo III por 4 somaclones (21,1 %) donde se incluye el cultivar original utilizado como control. Estos resultados indican que se obtuvieron un total de 15 somaclones (78,93 %) que difieren del cultivar original, lo que evidencia la efectividad de las técnicas biotecnológicas empleadas para la obtención de nueva variabilidad genética en esta especie.

Tabla 3. Estadígrafos fundamentales que caracterizan los grupos obtenidos

Grupos	Estadígrafos	Variables evaluadas							
		PPF	**PTF**	**DE**	**DP**	**SS**	**% H**	**NFT**	**Resist.**
I	**Media**	**182,49**	2660,37	**5,31**	4,55	4,57	96,25	14,5	2,01
	DS	16,25	1075,27	0,37	0,28	0,55	0,89	5,72	0,65
	CV	0,08	0,40	0,07	0,06	0,12	0,01	0,39	0.32
II	**Media**	140,37	**3554,71**	4,59	4,28	4,56	96,18	**24,42**	**3,02**
	DS	19,91	2007,58	0,41	0,17	0,67	1,09	12,31	0,48
	CV	0,14	0,56	0,08	0,04	0,14	0,01	0,50	0,16
III	**Media**	137,02	1150,0	4,62	3,91	4,47	96,35	9,0	2,08
	DS	12,51	531,08	0,19	0,47	0,31	0,30	5,14	0,35
	CV	0,09	0,46	0,04	0,12	0,06	0,03	0,57	0,17

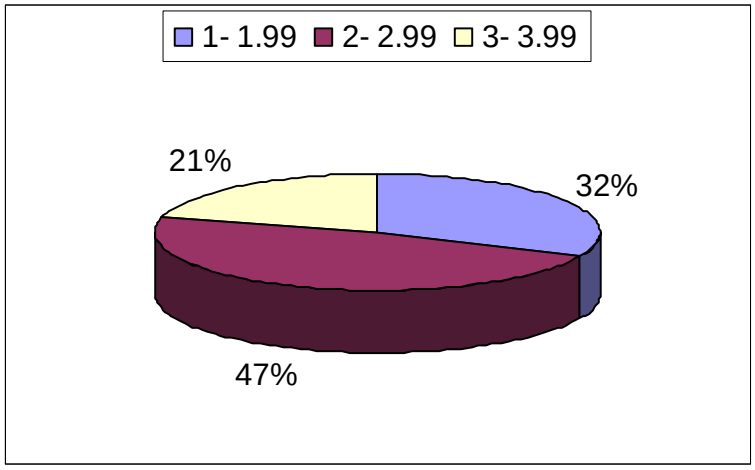
En la tabla 3 se muestran los estadígrafos de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación) para cada grupo formado. El grupo I agrupa los materiales de mayor valor de las variables masa promedio de los frutos

(182,49 g) y menor afectación frente al ataque de *A. solani* (2,01), el grupo II se caracteriza por tener un mayor número de frutos por planta (24,42) y mayor grado de afectación frente al patógeno (3,02), mientras que el grupo III tiene los menores valores de los componentes del rendimiento.

En cuanto a los valores de porcentaje de humedad y sólidos solubles, estos se mantuvieron muy similares en todos los grupos formados, oscilando este último entre los valores de 4,47 y 4,57%, valores comprendidos en el rango que caracteriza a la mayoría de las variedades de tomate (4,5 y 5,5%) (Pratta *et al.,* 1996).

Al analizar el comportamiento en condiciones de campo de los somaclones de tomate ante el ataque de *Alternaria solani* (figura 4) se observa que el 32% de los materiales mostraron una afectación menor (grado 1-1,99) que el control, el cv. ´Cuba C- 2781´ (grado 2) determinada según el grado de la escala utilizada. Sin embargo, solamente se encontró una correlación del 37,5% entre la respuesta obtenida en condiciones semi-controladas y la obtenida en condiciones de campo (tabla 4), resultando los somaclones identificados como 16, 24 y 58 menos afectados ante el ataque del patógeno que el cultivar original.

Figura 4. Comportamiento de los somaclones de tomate según su respuesta a *Alternaria solani.*



Estos tres somaclones están ubicados en el grupo I según el Análisis de Conglomerados realizado, el cual presenta mayores valores de masa promedio de los frutos (181,94 g) y peso total de los frutos (3688,33 g) que el cultivar original (117,6 g y 1900 g respectivamente), por lo que pueden ser propuestos para continuar estudios encaminados a la búsqueda de genotipos con tolerancia a *Alternaria solani* que presenten rendimientos aceptables.

Tabla 4. Correspondencia entre el comportamiento de los somaclones en condiciones semi-controladas y condiciones de campo.

Somaclones	Comportamiento en condiciones semi-controladas	Comportamiento en condiciones de campo (grado de la escala)
Control (Cuba C-2781)	Altamente susceptible	2,00
16	Moderadamente resistente	**1,38**
38	Moderadamente resistente	3,00
52	Moderadamente resistente	3,20
72	Moderadamente resistente	2,00
17	Resistente	3,71
24	Resistente	**1,94**
35	Resistente	2,60
58	Resistente	**1,00**
		37,5%

CONCLUSIONES

- La evaluación realizada en condiciones de campo permitió detectar variaciones en la respuesta de los somaclones estudiados, en cuanto a los caracteres relacionados con el rendimiento y la respuesta frente al ataque de *Alternaria solani*, lo cual evidencia la importancia de las técnicas biotecnológicas en la obtención de nueva variabilidad genética.
- Se propone continuar los estudios con los somaclones 16, 24 y 58, ya que muestran mayores valores de masa promedio de los frutos y peso total de los frutos que el cultivar original, además de un mayor grado de tolerancia al ataque de *Alternaria solani*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Álvarez M y Torres V (1993): Análisis de correlaciones de variedades y líneas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Cultivos Tropicales, 5 (1): 49- 59.

Al-Zahim MA, Ford-Lloyd BV y Newbury HJ (1999): Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. Plant Cell Rep., 18: 473-477.

Capote A, González-Chávez M, Peteira B, Rodríguez N, Pérez, O y Marrero N (2004): Selección *in vitro* y caracterización de líneas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) resistentes a *Alternaria solani*. Memorias BioVeg'03. Ciego de Avila, ISSN

Carvalho JB, de Brito L, Boiteux L y Alberto M (1994): Cultivo do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) para industrilização. Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças (CNPH), 36 pág.

García RL, Veitía N, Dita MA, Bermúdez Y, Clavelo J, Romero C y García L (1998): Empleo del cultivo de tejidos y la mutagénesis *in vitro* para la mejora de resistencia a *Alternaria solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.) var. 'Desirée'. Resúmenes III

Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, 1-5 Junio, La Habana, pág. 203.

Hernández MM, Kowalski B, Lorenzo P y Ortiz U (1991): Efectividad del empleo de filtrados de *Alternaria solani* Ellis y Martin (Jones y Grout) en la selección *in vitro* de formas resistentes en papa (*Solanum tuberosum* L.). Cultivos Tropicales, 12(2): 48 – 50.

Ingram DS y MacDonald MV (1985): Selection of mutants *in vitro*: Text of lecture. International Symposium on Nuclear Techniques and *in vitro* Culture for Plant Improvement. Vienna, Austria, 19-23 August.

GNAU (2000): Manual Técnico de Organopónico y Huertos Intensivos. Agrinfor, 145 pág.

Miller JC y Tanksley SD (1990): RFLP analysis of phylogenetic relationship and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. Theor. Appl. Genet., 80: 437 – 448.

Murashige T. y Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15: 473- 497.

Nuez F (1995): El cultivo del tomate. Madrid, Ediciones Mundi Prensa, 793 pág.

Peralta IE, Knapp S y Spooner DM (2005): New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from northern Peru. Systematic Botany, 30 (2): 424- 434.

Pratta G, Zorzoli R y Picardi LA (1996): Evaluación de caracteres de interés agronómico en especies del género *Lycopersicon*. Horticultura Argentina, 15 (3): 25- 32.

Sheppard SKL y Sohndal MR (1986): Selection for early blight disease resistance in tomato: Use of tissue culture with *Alternaria solana* culture filtrate. 6th Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture. Abstr. Univ. Minnesota, Minneapolis, E.U., pág. 211.